

特 許 協 力 条 約

P C T

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

（法第 12 条、法施行規則第 56 条）

〔P C T36 条及びP C T規則 70〕

出願人又は代理人 の書類記号 A141-05US	今後の手続きについては、様式P C T／I P E A／4 1 6を参照すること。	
国際出願番号 P C T／J P 2 0 0 5／0 0 5 3 5 0	国際出願日 (日. 月. 年) 2 4. 0 3. 2 0 0 5	優先日 (日. 月. 年) 2 9. 0 3. 2 0 0 4
国際特許分類 ( I P C ) Int.Cl. C12N15/00(2006. 01), A01K67/027(2006. 01), C12N5/00(2006. 01)		
出願人 (氏名又は名称)  独立行政法人科学技術振興機構		

1. この報告書は、P C T35 条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。 法施行規則第 57 条 ( P C T36 条 ) の規定に従い送付する。	
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。	
3. この報告には次の附属物件も添付されている。 a. <input checked="" type="checkbox"/> 附属書類は全部で 1 ページである。  <input checked="" type="checkbox"/> 補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面の用紙 ( P C T規則 70. 16 及び実施細則第 607 号参照)  <input type="checkbox"/> 第 I 欄 4. 及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙  b. <input type="checkbox"/> 電子媒体は全部で (電子媒体の種類、数を示す)。 配列表に関する補充欄に示すように、電子形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。 (実施細則第 802 号参照)	
4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  <input checked="" type="checkbox"/> 第 I 欄 国際予備審査報告の基礎 <input type="checkbox"/> 第 II 欄 優先権 <input type="checkbox"/> 第 III 欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 <input type="checkbox"/> 第 IV 欄 発明の単一性の欠如 <input checked="" type="checkbox"/> 第 V 欄 P C T35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 <input type="checkbox"/> 第 VI 欄 ある種の引用文献 <input type="checkbox"/> 第 VII 欄 国際出願の不備 <input type="checkbox"/> 第 VIII 欄 国際出願に対する意見	

国際予備審査の請求書を受理した日 2 8. 0 9. 2 0 0 5	国際予備審査報告を作成した日 2 3. 0 6. 2 0 0 6		
名称及びあて先 日本国特許庁 ( I P E A／J P ) 郵便番号 1 0 0－8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 水落 登希子	4 B	3 5 4 1
	電話番号 0 3－3 5 8 1－1 1 0 1 内線 3 4 4 8		

第 I 欄 報告の基礎

1. 言語に関し、この予備審査報告は以下のものを基礎とした。

- ☒ 出願時の言語による国際出願
- ☐ 出願時の言語から次の目的のための言語である \_\_\_\_\_ 語に翻訳された、この国際出願の翻訳文
- ☐ 国際調査（P C T 規則12.3(a)及び23.1(b)）
- ☐ 国際公開（P C T 規則12.4(a)）
- ☐ 国際予備審査（P C T 規則55.2(a)又は55.3(a)）

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。（法第6条（P C T 14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。）

- ☐ 出願時の国際出願書類
- ☒ 明細書
- 第 1 - 1 8 \_\_\_\_\_ ページ、出願時に提出されたもの
- 第 \_\_\_\_\_ ページ\*、 \_\_\_\_\_ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
- 第 \_\_\_\_\_ ページ\*、 \_\_\_\_\_ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
- ☒ 請求の範囲
- 第 1 , 9 \_\_\_\_\_ 項、出願時に提出されたもの
- 第 \_\_\_\_\_ 項\*、P C T 1 9 条の規定に基づき補正されたもの
- 第 2 - 8 \_\_\_\_\_ 項\*、2 8 . 0 9 . 2 0 0 5 付けで国際予備審査機関が受理したもの
- 第 \_\_\_\_\_ 項\*、 \_\_\_\_\_ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
- ☒ 図面
- 第 1 - 7 \_\_\_\_\_ ページ / 図、出願時に提出されたもの
- 第 \_\_\_\_\_ ページ / 図\*、 \_\_\_\_\_ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
- 第 \_\_\_\_\_ ページ / 図\*、 \_\_\_\_\_ 付けで国際予備審査機関が受理したもの
- ☐ 配列表又は関連するテーブル
- 配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☐ 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ / 図
- ☐ 配列表（具体的に記載すること） \_\_\_\_\_
- ☐ 配列表に関連するテーブル（具体的に記載すること） \_\_\_\_\_

4. ☐ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（P C T 規則 70.2(c)）

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ / 図
- ☐ 配列表（具体的に記載すること） \_\_\_\_\_
- ☐ 配列表に関連するテーブル（具体的に記載すること） \_\_\_\_\_

\* 4. に該当する場合、その用紙に “superseded” と記入されることがある。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第 12 条（P C T 35 条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性（N）	請求の範囲	1－9	有
	請求の範囲		無
進歩性（I S）	請求の範囲	2－8	有
	請求の範囲	1， 9	無
産業上の利用可能性（I A）	請求の範囲	1－9	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明（P C T 規則 70.7）

文献 1. Phil.Trans.R Soc.Lond.B Biol. Sci. Vol.358, No.1432, p.797-804 (29 April 2003)  
文献 2. Neuron Vol.12, p.943-956 (1994)  
文献 3. Neuron Vol.36, p.493-505 (2002)  
文献 4. Brain Res., Vol.933, No.1 p.1-11 (2002)  
文献 5. Biochem. J., Vol.378, p.1-16 (2004.02.15)

1. 補正後の請求の範囲 1， 9に係る発明は、国際調査で引用された文献 1－4 と新たに引用した文献 5 により、進歩性を有しない。

文献 1 には、脳の高次機能の一つである記憶につながるメカニズムの一つと考えられている Long-term potentiation(LTP)の神経細胞内の作用機構について、カルシウムと Caumodulin による制御機構があり、特に神経細胞の後シナプス部位に大量に存在する Calcium/calmodulion-dependent protein kinase II (CaMKII)が重要な働きをになっていること、そして、CaMKII の isoform のなかでも CaMKII  $\alpha$  の遺伝子ノックアウト動物で LTP が消失することから、CaMKII  $\alpha$  が LTP の形成に重要であること、CaMKII  $\alpha$  による神経機能の調節は、自己リン酸化、他の蛋白質のリン酸化、ホスファターゼによる脱リン酸化等の反応により生じること、また、Thr286 の自己リン酸化により CaMKII の活性化が持続することが記載されている。さらに、その自己リン酸化部位である Thr286 を他のアミノ酸に置換したノックインマウスの実験から、この部位が海馬における LTP、記憶に関与していること、Thr286 のリン酸化に続く阻害的に働く自己リン酸化部位 Thr305/306 のリン酸化が、CaMKII  $\alpha$  の postsynaptic density (PSD) への移行に必要であることが記載されている。一方、文献 2 には、CaMKII  $\alpha$  のリン酸化について、自己リン酸化が CaMKII  $\alpha$  の近傍に存在する分子間の反応であり、また、ATP 結合部位である Lys42 を Met, Arg 等の他のアミノ酸に置換するとキナーゼ活性が不活性化するが calmodulin との結合能があることが記載されている。文献 3 には、CaMKII  $\alpha$  の自己リン酸化部位である Thr305/306 を他のアミノ酸に置換したノックインマウスの作成法、該ノックインマウスで、海馬での CaMKII  $\alpha$  の PSD への結合が障害され、そして LTP の形成や記憶の障害がおこることが記載されている。文献 4 には、CaMKII の脳内分布について記載され、CaMKII が脳のほとんどすべての領域に分布し、側坐核にも多く分布していることが記載されている。そして新たに引用した文献 5 には、CaMKII  $\alpha$  の分子構造、Thr286 や Thr305/306 の自己リン酸化による CaMKII  $\alpha$  の活性の制御機構や自己リン酸化の生理的役割について、Thr286 や Thr305/306 を他のアミノ酸で置換したノックインマウスにより検討された結果、そして、CaMKII  $\alpha$  によってリン酸化される基質となるタンパク質、それぞれの基質タンパク質の結合する CaMKII  $\alpha$  の結合ドメインが記載されている (Table 1)。

出願人は答弁書において、CaMKII  $\alpha$  ノックアウトマウスでは、半数には異常がみられないという文献があること、CaMKII  $\alpha$  ノックアウトマウスは繁殖能力に問題があるが本願発明のノックインマウスでは出生がメンデルの法則に従っていること、従来のノックインマウスはエクソン 1 1， 1 2 に存在する部分であるが、本願発明のノックイン動物では改変位置が異なりエクソン 2 に存在するから技術的困難を伴っていたこと、本願発明のノックインマウスでは側坐核において特異的に神経活動の低下が認められるが大腦皮質や線条体での活動には変化がみられず予測できない効果である、旨、主張する。

(補充欄に続く)

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第 V 欄の続き

しかし、文献1に記載のように、CaMKII  $\alpha$  は神経細胞の活動に深く関わり、神経機能の調節は、CaMKII  $\alpha$  の3つのドメインによる自己リン酸化、他の蛋白質のリン酸化、ホスファターゼによる脱リン酸化等の反応により生じることが周知であり、文献2，3，5にCaMKII  $\alpha$  の機能のうち、自己リン酸化部位 Thr286 や Thr305/306 を他のアミノ酸に置換したノックインマウスの存在、そして、自己リン酸化部位の機能、生理的役割について検討された結果が記載されている。したがって、それぞれのドメインの生理的役割を明らかにするために、もう一つの機能であるキナーゼ活性ドメインについて、ATP 結合部位である Lys42 等のアミノ酸を他のアミノ酸に置換し、キナーゼ活性が欠損するが、calmodulin との結合やサブユニット同士の多量体形成は保持しているようなノックイン動物を作成しようとすることは、当業者が容易に想到することであり、本願優先日当時の技術を勘案すれば当業者であればなしうることである。

### 請求の範囲

1. 相同染色体の一方又は双方の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II $\alpha$  (CaMKII $\alpha$ ) 遺伝子を不活性型に置換し、不活性型 CaMKII $\alpha$  を発現するように改変することによって CaMKII $\alpha$  のプロテインキナーゼ活性が特異的に障害される一方、CaMKII $\alpha$  のカルモジュリン結合能およびサブユニット同士の多量体形成能は保持されていることを特徴とする不活性型 CaMKII $\alpha$  ノックイン非ヒト動物。
2. (補正後) 野生型と比較して脳内側坐核における神経活動が相対的に低下している一方、大脳皮質および線条体での神経活動は野生型と比較して実質的な差異がないことを特徴とする請求項 1 記載の不活性型 CaMKII $\alpha$  ノックイン非ヒト動物。
3. (補正後) 遺伝子ターゲティング法により作製されたことを特徴とする請求項 2 記載の不活性型 CaMKII $\alpha$  ノックイン非ヒト動物。
4. (補正後) CaMKII $\alpha$  の触媒ドメインにおける 1 又は複数のアミノ酸残基を改変したことを特徴とする請求項 3 記載の不活性型 CaMKII $\alpha$  ノックイン非ヒト動物。
5. (補正後) ATP との結合に必要な 1 又は複数のアミノ酸残基を改変したことを特徴とする請求項 4 記載の不活性型 CaMKII $\alpha$  ノックイン非ヒト動物。
6. (補正後) ATP との結合に必要なリジン残基を改変したことを特徴とする請求項 5 記載の不活性型 CaMKII $\alpha$  ノックイン非ヒト動物。
7. (補正後) 齧歯目動物であることを特徴とする請求項 2～6 のいずれか 1 項に記載の不活性型 CaMKII $\alpha$  ノックイン非ヒト動物。
8. (補正後) マウスであることを特徴とする請求項 7 記載の不活性型 CaMKII $\alpha$  ノックイン非ヒト動物。
9. 相同染色体の一方又は双方の  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II $\alpha$  (CaMKII $\alpha$ ) 遺伝子を不活性型に置換し、不活性型 CaMKII $\alpha$  を発現するように改変することによって CaMKII $\alpha$  のプロテインキナーゼ活性が特異的に障害される一方、CaMKII $\alpha$  のカルモジュリン結合能およびサブユニット同士の多量体形成能は保持されていることを特徴とする不活性型 CaMKII $\alpha$  ノックイン細胞。